

Revue suisse Zool.	Tome 87	Fasc. 4	p. 869-873	Genève, décembre 1980
--------------------	---------	---------	------------	-----------------------

Charakterisierung des Chymotrypsin-Inhibitors bei *Culex pipiens*¹

von

A. SPIRO-KERN und P. S. CHEN

Mit 2 Tabellen

ABSTRACT

Characterization of the chymotrypsin inhibitor in *Culex pipiens*. — Affinity chromatography was used to isolate a species-specific chymotrypsin (CHT) inhibitor from adult mosquitoes of *Culex pipiens*. The modification of our previous procedure (SPIRO-KERN & CHEN 1977) by employing a gradient buffer system to elute the inhibitory component from the CHT-sepharose column yielded a very symmetrical peak with maximum at pH 2.8, and there is no evidence for the occurrence of iso-inhibitors. The CHT-inhibitor shows an unusually high stability against changes in pH as well as various precipitating and denaturing reagents. Of particular significance is its thermostability: the heat treatment at 97° C for 5 min not only caused no reduction of the inhibitory activity, but even resulted in a 192% increase. The association of CHT and inhibitor occurs within 10 sec, but can be greatly delayed by preincubation of the enzyme with a competitive substrate. Under our experimental conditions the enzyme-inhibitor-complex appears to be quite stable.

EINLEITUNG

In einer früheren Arbeit (SPIRO-KERN & CHEN 1977) haben wir über die Isolierung eines artspezifischen Chymotrypsin (CHT)-Inhibitors von *Culex pipiens* berichtet. Dabei wurde in einem ersten Schritt *Culex*-CHT aus Mückenlarven mit Affinitätschromatographie in genügender Menge gewonnen und anschliessend an Sepharose-4B gekoppelt. Das kovalent gebundene Enzym diente dann als Ligand für die Reindar-

¹ Ausgeführt mit Unterstützung durch den Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung und der Georges und Antoine Claraz-Schenkung.

Vortrag gehalten an der Jahresversammlung der SZG in Lausanne, 8.-9. März 1980.

stellung des Inhibitors. Elektrophoretisch erweist sich der Inhibitor als weitgehend rein. Gemäss Gelfiltration besitzt er ein Molekulargewicht von ca. 6800. Auffallend ist seine ausserordentliche Stabilität gegenüber pH-Veränderungen, Hitzebehandlung sowie denaturierenden und präzipitierenden Reagentien. Unter optimaler Bedingung und bei hoher Konzentration kann eine 82%ige Hemmung der CHT-Aktivität erreicht werden. Die Hemmwirkung ist gleich für *Culex*- und *Aedes*-CHT und vermindert für Rinder-CHT. Hingegen wird weder *Culex*- noch Rinder-Trypsin gehemmt, was für eine hohe Spezifität des von uns isolierten Inhibitors spricht. CHT-Inhibitoren wurden bei Imagines von *Aedes aegypti* (YANG & DAVIS 1972) nachgewiesen und aus Larven von *Drosophila melanogaster* (KANG & FUCHS 1974) isoliert. Da diese Autoren für die Isolierung rohe Homogenate oder konventionelle Methoden verwendet haben, ist die Spezifität der von ihnen gereinigten Inhibitoren fraglich.

Um den *Culex*-Inhibitor möglichst schonend aus der CHT-Säule zu eluieren, haben wir neuerdings ein Gradienten-Puffersystem ausgearbeitet. Ausserdem wurden in weiteren Versuchen die Eigenschaften des Inhibitors, insbesondere diejenigen des Enzym-Inhibitor-Komplexes (SPIRO-KERN & CHEN 1978), einer genaueren Charakterisierung unterzogen. Im folgenden beschränken wir uns auf einige wesentliche Ergebnisse. Die Veröffentlichung der Einzelheiten soll in einer späteren Arbeit erfolgen.

MATERIAL UND METHODEN

Adultmücken des anautogenen Stammes *Culex pipien fatigans* wurden bei 25° C aufgezogen. Die Larven wurden mit gefriergetrockneten Infusorien gefüttert. Nach dem Schlüpfen wurden die Mücken mit Zuckerwasser gehalten.

Die genauen Angaben über die Herstellung von Enzym- und Inhibitorproben sowie ihre Reinigung mittels Affinitätschromatographie befinden sich in SPIRO-KERN & CHEN (1977). Einzig wurde für die Ablösung des Inhibitors von der CHT-Säule, an Stelle einer abrupten pH-Aenderung, ein Gradienten-Puffersystem von pH 5 bis 2 verwendet (siehe unten). Die Bestimmung der CHT-Aktivität wurde mit dem synthetischen Substrat N-Glutaryl-L-phenylalanin-nitroanilid (GPNA) nach den Angaben von ERLANGER *et al.* (1966) durchgeführt. Die Reduktion des durch die Hydrolyse freigesetzten p-Nitroanilids bildet die Grundlage für die Bestimmung der Hemmwirkung des Inhibitors (siehe SPIRO-KERN & CHEN 1977).

Der CHT-Inhibitor-Komplex wurde hergestellt durch Zugabe von *Culex*-CHT in 0,05 M Tris-Puffer zu einer 90%igen äquimolaren Menge von Inhibitorlösung und anschliessende Ausfällung in 50%igem Aethanol. Die Ausbeute beträgt 70%.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

1. Reinheit des CHT-Inhibitors

Bei der Inhibitor-Reinigung haben wir bisher die CHT-Sepharose-Säule, an der der Inhibitor gebunden war, mit 0,8 M Boratpuffer, pH 8,0, äquilibriert und gewaschen; die Ablösung des Inhibitors erfolgte durch Elution mit 0,2 M KCl-HCl, pH 2,0. Die elektrophoretische Prüfung der Reinheit der so gewonnenen Fraktion mit 7,5%igem Polyacrylamidgel ergab eine starke und eine sehr schwache Bande. Bei der letzteren könnte es sich um eine Verunreinigung des Präparates oder um einen sogenannten

Iso-Inhibitor handeln. Trypsin-Iso-Inhibitoren wurden bei Schnecken (TSCHETSCHÉ & DIETL 1976) und Fischen (TSCHETSCHÉ 1976) gefunden. In neueren Versuchen verwendeten wir für die Elution ein Gradientensystem (pH 2,0 bis 5,0). Es zeigte sich, dass der abgelöste Inhibitor in einem einzigen, symmetrischen Peak erschien mit einem Maximum bei pH 2,8. Es gab keinen Hinweis, dass die schwache Bande einen Iso-Inhibitor darstellen könnte. Ferner zeigt der vorliegende Versuch, dass bereits ein weniger saurer Puffer (pH 2,8) die Affinität von CHT zum Inhibitor so weit reduziert, dass die Ablösung erfolgt.

2. Stabilität des CHT-Inhibitors

Die auffallendste Eigenschaft des isolierten CHT-Inhibitors, die er mit vielen natürlich vorkommenden Protease-Inhibitoren teilt, ist seine ausserordentliche physikalisch-chemische Stabilität. Unter Bedingungen, die normalerweise Denaturierung bewirken, bleibt seine Aktivität erhalten. Wie aus Tabelle 1 ersichtlich ist, erweist sich die Hemmwirkung des Inhibitors in 0,1 M Pufferlösungen von pH 4 bis 10 als vollständig normal selbst nach einer Inkubationszeit von 48 h bei 20° C. Erst bei pH 2 wird sie um 28% reduziert. Von besonderem Interesse ist seine Thermostabilität. Die Hitzebehandlung bei 60° C während 1 h ergibt keine Verminderung der Hemmwirkung; bei 97° C und einer Behandlungsdauer von 5 min stellten wir sogar eine Erhöhung der inhibitorischen Aktivität um 192% fest. Denaturierende und präzipitierende Reagentien wie Harnstoff,

TABELLE 1.
Stabilität des Culex CHT-Inhibitors

	Tem- pérature	pH	Inkuba- tion	Agentien	Inhibitor- Aktivität(%)
pH-Stabilität	20° C	4-9 2 10	48 h		100 72 94
Thermostabilität	60° C 97° C	7,8	1 h 5 min		100 192 !
Denaturierende Reagentien		7,8	30 min	8 M Harnstoff 0,05 M Mercaptoäthanol 0,05 M Mercaptoäthanol in 8 M Harnstoff Perameisensäure konz	100 92 10 0
Präcipitierende Reagentien				Ammoniumsulfat gesättigt Trichloressigsäure 2,5% Aethanol 95%	100 100 100

TABELLE 2.

Stabilität des CHT-Inhibitor-Komplexes

	Temperatur	Zeit	pH	Komplex- stabilität (%)	Inhibitor Aktivität (%)	CHT- Aktivität (%)
Thermostabilität	50° C	60 min	7,8	100	—	—
	70° C	30 min		28	72	0
	70° C	60 min		0	97	0
pH-Stabilität	20° C	60 min	2	0	100	78
			4—9	100	—	—
			10	62	38	0
Harnstoff	20° C	60 min		100	—	—
				23	77	10
				0	100	0

Mercaptoäthanol, Ammoniumsulfat, Trichloressigsäure und Äthanol in den in Tabelle 1 aufgeführten Konzentrationen beeinträchtigen weder die Hemmwirkung noch die Löslichkeit des Inhibitors. Einzig in konzentrierter Perameisensäure oder in einer Kombination von Mercaptoäthanol und Harnstoff verliert der Inhibitor seine Aktivität.

Es bleibt abzuklären, welche molekulare Grundlage für diese ausserordentliche Stabilität verantwortlich ist. Mit Ausnahme der grossen Serum-Inhibitoren weisen praktisch alle Protease-Inhibitoren einen ungewöhnlich hohen Anteil an Halbcystin-Resten auf (10-15%). Die dadurch bedingten extensiven Disulfidbindungen und damit die Sekundärstruktur sind vermutlich ein wichtiger Faktor für diese Stabilität.

3. *Bildung und Stabilität des Enzym-Inhibitor-Komplexes*

Um den zeitlichen Ablauf der Bildung des Enzym-Inhibitor-Komplexes zu verfolgen, wurden *Culex*-CHT und Inhibitor in 0,05 M Tris-Puffer bei pH 7,8 und 20° C inkubiert, und in regelmässigen Zeitabständen wurde die verbliebene CHT-Aktivität mit GPNA-Substrat geprüft. Es zeigte sich, dass die Assoziation von Enzym und Inhibitor sehr rasch erfolgt, und der maximale Hemmgrad innerhalb 10 sec erreicht wird. Die Konzentration des Inhibitors hat keinen Einfluss auf die Reaktionsgeschwindigkeit.

Nach den Angaben von Green (1953) kann die Komplexbildung verlangsamt werden, indem man der Enzymlösung ein kompetitierendes Substrat zugibt und dem Gemisch nach 60 sec den Inhibitor beifügt. Unter der vorliegenden Bedingung wird das Hemmgleichgewicht erst nach 240 sec erreicht.

Die rasche Komplexbildung deutet darauf hin, dass das Gleichgewicht der Reaktion auf der Seite des Produktes liegt und der Enzym-Inhibitor-Komplex vermutlich recht stabil ist. Tabelle 2 zeigt, dass dieser nach einer Hitzebehandlung bei 50° C während 60 min intakt bleibt. Die Dissoziation erfolgt erst bei 70° C. Ebenfalls erweist er sich als stabil im Bereich von pH 4 bis 9 und in einer 4 M Harnstofflösung. Erst bei pH 2

oder bei einer 5-7 M Harnstoffkonzentration wird der Komplex dissoziiert. Der Unterschied in seiner pH-Stabilität bildet die Grundlage für die affinitätschromatographische Reinigung des Inhibitors. Aus Tabelle 2 geht ferner hervor, dass nur bei Dissoziation nach pH-Senkung noch CHT-Aktivität nachgewiesen werden konnte, während nach Hitze- und Harnstoffbehandlung das Enzym inaktiviert worden war.

Schliesslich muss erwähnt werden, dass die von uns festgestellten experimentellen Bedingungen für die Dissoziation wohl kaum in vivo vorkommen. Die Prüfung des Komplexes auf ein Wiederauftreten von CHT-Aktivität bei pH 7,8 und Zimmertemperatur war negativ. Hingegen stellten wir in einem weiteren Versuch fest, dass der Inhibitor im Komplex durch Trypsin inaktiviert werden konnte, und nach 26 h wieder CHT-Aktivität auftrat.

LITERATUR

- ERLANGER, B., F. EDEL and A. COOPER. 1966. The action of chymotrypsin on two chromogenic substrates. *Archs Biochem. Biophys.* 115: 206-210.
- GREEN, N. M. 1953. Competition among trypsin inhibitors. *J. biol. Chem.* 205: 535-551.
- KANG, S. H. and M. S. FUCHS. 1974. Isolation of a chymotrypsin inhibitor from *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochem.* 4: 1-8.
- SPIRO-KERN, A. and P. S. CHEN. 1977. Isolation of a chymotrypsin inhibitor from *Culex pipiens* by affinity chromatography. *Insect Biochem.* 7: 453-457.
- 1978. A chymotrypsin inhibitor from adult *Culex pipiens* isolated by affinity chromatography. In « Affinity Chromatography » (O. HOFFMANN-OSTENHOF, ed.), pp. 119-122. *Pergamon Press, Oxford and New York*.
- TSCHECHS, H. 1976. Trypsin kallikrein inhibitors from cuttle fish. In « Methods in Enzymology » (L. LORAND, ed.), Vol. XLV, pp. 792-797. *Academic Press, New York*.
- TSCHECHS, H. and T. DIETL. 1976. Trypsin-kallikrein inhibitors from snails. In « Methods in Enzymology » (L. LORAND, ed.), Vol. XLV, pp. 772-785. *Academic Press, New York*.
- YANG, Y. J. and D. M. DAVIS. 1972. A mosquito chymotrypsin inhibitor in tissues of adult *Aedes aegypti*. *Comp. Biochem. Physiol.* 43B: 137-141.

Anschrift der Verfasser :

Zoologisches Institut der Universität
Winterthurerstrasse 190
CH-8057 Zürich (Schweiz)
